

8º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Avaliação da População de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em Reator de Meio Poroso

AUTORES:

Joalene A. S. Ferreira¹, I.C.Sampaio¹, J. Nunes¹, J.B.Matos¹, P. F. Almeida^{1*}

1 Departamento de Biointeração, ICS/UFBA. *pfatk@yahoo.com.br

INSTITUIÇÃO:

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Avaliação da População de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em Reator de Meio Poroso

Abstract

The aim of this study is the quantification of sulfetogênicos microorganisms in a bioreactor porous medium, through methods of direct counting under a microscope with fluorophores and by the technique of most probable number. This evaluation was done before the reactor start-up process to assess the efficiency of the system as a biofilm in the middle of the grip, and also to check the growth kinetics of the profile of the population inoculated BRS. For, it is a mixed culture of microorganisms sample taken from water produced from an oil field. For this study was assembled an experiment lasting 09 days and hydraulic retention time 09 days. The initial population of the BRS reactor was inoculated 2×10^6 NMP / mL of SRB and H_2S concentration of 25 ppm.

Key words: Bacteria Reducing sulfate; Quantification of Microorganisms

Resumo

O objetivo desse trabalho é a quantificação de micro-organismos sulfetogênicos em um biorreator de meio poroso, através de metodologias de contagem direta ao microscópio e pela técnica do número mais provável. Essa avaliação foi feita antes do início do processo de start-up do reator para avaliar a eficiência do sistema quanto a aderência do biofilme no meio, e também para verificar o perfil da cinética de crescimento da população de BRS inoculada. Pois, trata-se de uma cultura mista de microrganismos retirados de amostra de água produzida de um campo de petróleo. Para esse estudo foi montado um experimento com duração de 09 dias e tempo de retenção hidráulica de 09 dias. A população inicial de BRS inoculada no reator foi 2×10^6 NMP/mL de BRS e concentração inicial de H_2S de 25 ppm.

Palavras Chaves: Bactérias Redutoras de Sulfato; Quantificação de Microrganismos

Introdução

Usualmente a identificação de bactérias nas instalações de produção de petróleo é feita através de métodos de cultura convencionais. No entanto, nem sempre os meios existentes permitem o cultivo de todos os microrganismos destes ambientes extremos, originando interpretações errôneas e dificuldades na correta identificação da microbiota que participam da biossulfetogênese. Dentro desse contexto, estão disponíveis métodos válidos para a contagem dessas bactérias, permitindo estudos quantitativos de sua ecologia, particularmente em relação a corrosão, poluição, formação de enxofre, e outros fenômenos de importância econômica (POSTGATE, 1959). Dentre esses métodos as técnicas do número mais provável (MPN – Most probable number), hibridização fluorescente *in situ* (FISH – Fluorescent in situ hybridization) e a contagem direta com laranja de acridina (AODC – Acridine Orange direct count) tem

sido amplamente utilizados na análise de amostras ambientais e em cultura (ALMEIDA et al., 2006; AMANN et al., 1990; BEHRENS, 2001; CARPENTER, 2013; OLIVER, 2005; SANTOS et al., 2010). O objetivo desse trabalho, portanto, é avaliar a população de BRS no reator de meio poroso através da técnica de NMP, antes dos testes de equilíbrio dinâmico e de substâncias inibidoras desse processo. Para isso, será utilizado uma batelada de 09 dias para análise de BRS pelo método de NMP e uma análise através de hibridização fluorescente.

Metodologia

O biorreator utilizado neste estudo é um cilindro de volume útil de 3,6 litros preenchido por perolas de vidros de diâmetro irregular como suporte para a formação de biofilme de BRS (Figura 1). A entrada do afluente purgado de oxigênio é feita através de um fluxo ascendente. O equipamento possui coleta de gás, controle de pressão (1,8 kgf/cm²), temperatura (± 38 °C) e quatro válvulas laterais para amostragem em perfil.

As análises para quantificar os micro-organismos presentes nas amostras foram realizadas através da técnica do número mais provável, e a hibridização fluorescente in situ. Para a análise pelas técnicas de FISH e AODC, utilizou-se o protocolo de Amman et al.,(1990). A Contagem direta com laranja de acridina, seguiu-se a metodologia de Glöckner et al.,(1996). A Hibridização com sondas de oligonucleotídeos, Santos et al., (2010) com adaptações. As lâminas de AODC e FISH foram visualizadas em um microscópio Olympus BX51 com uma câmera Olympus Q-Color para captura de imagens. Bactérias coradas com o DAPI ou com a sonda marcada com o fluoróforo Alexa 555 foram visualizadas com seus respectivos conjuntos de filtros (U-MWU2 – 330/420nm e U-MSWG2 – 480/590nm).



Figura 1: Biorreator
Fonte: Acervo dos autores

Resultados e Discussão

Foram visualizadas bactérias de diferentes morfologias (vibriões, bacilos, estreptobacilos e espirilos) coradas tanto com o DAPI, quanto com a sonda. O DAPI é um fluoróforo que permite a visualização de todas as bactérias presentes na amostra em coloração azul, já a sonda é específica para bactérias redutoras de sulfato, sendo conjugada a um fluoróforo que cora as células de vermelho.

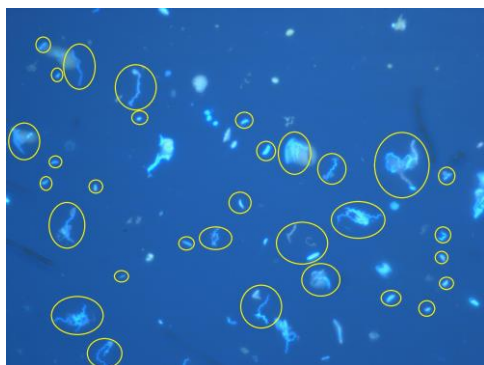


Figura 2: Visualização total de bactérias com o DAPI

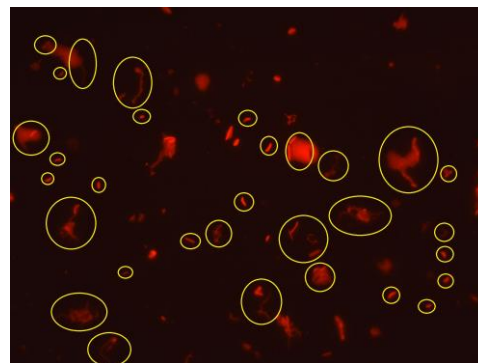


Figura 3: Visualização total de bactérias com BRS

Nas figuras 2 e 3 apresenta um mesmo campo da amostra 1 com a visualização do DAPI e da sonda, mostrando total complementaridade entre as bactérias totais e as BRS. As contagens microbianas ao microscópio obtiveram concentrações microbianas entre 10^4 e 10^7 bactérias/mL.

A figura 4 mostra a concentração total de bactérias, sendo a porcentagem de BRS entre 88,17% e 100%.

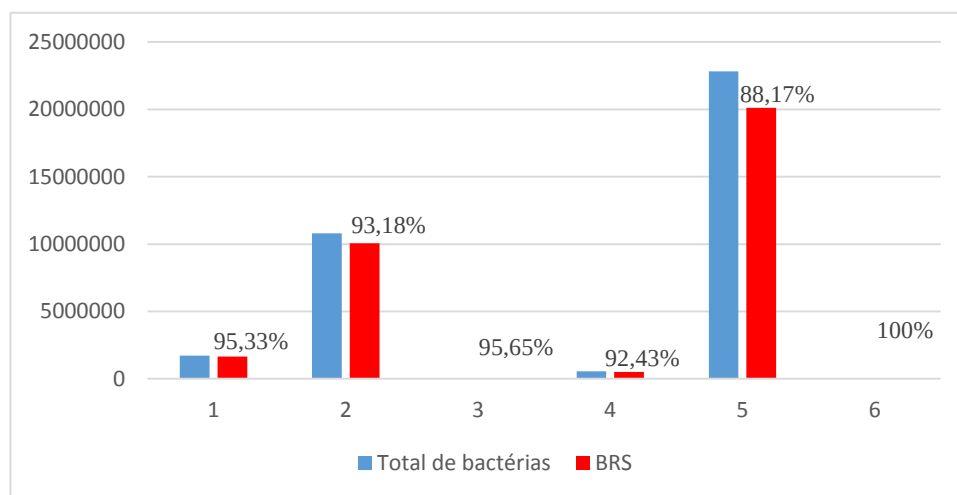


Figura 4: Hibridização fluorescente in situ - Bactérias/mL

As BRS constituem um grupo diverso de procariotos e com base em análises da sequência de rRNA, elas podem ser divididas em quatro grupos: BRS mesofílicas Gram-negativas; BRS formadoras de esporos Gram-positivas; BRS bacterianas termofílicas; e BRS arqueas termofílicas. Todos esses grupos são caracterizados pelo uso do sulfato comoceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbica (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000). A maioria das BRS mesofílicas isoladas a partir de variados campos de petróleo pertencem ao gênero *Desulfovibrio*. Outras BRS mesofílicas pertencem ao gênero

Desulfotomaculum, Desulfomicrobium, Desulfobacter e Desulfobacterium (AGRAWAL; VANBROEKHOVEN; LAL, 2010). Essas BRS são em maioria halotolerantes ou moderadamente halofílicas, e crescem otimamente entre 30 e 40°C (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000). Devido a essa variedade, diferentes sondas de oligonucleotídeos podem ser necessárias para detectar todas os subgrupos de BRS (SANTOS et al., 2010). Considerando essas informações e o fato das amostras terem sido obtidas de um reator operando em sulfetogênese, existem duas possibilidades para a discrepância do número total de bactérias não ser igual ao de BRS nas contagens: A primeira, como as imagens foram analisadas manualmente, esse pode ser o resultado do erro do operador, ou a segunda possibilidade, que as demais bactérias não hibridizadas pela sonda SRB 385, podem pertencer a outros grupos de BRS.

A figura 5 mostra o perfil da concentração de sulfato e sulfeto no reator ao longo do tempo (período de 9 dias). A medida que a concentração de sulfato diminui (consumo de substrato), ocorre aumento na concentração de sulfeto (formação de produto). Sendo que o sulfeto atinge sua concentração máxima no sétimo dia. Neste experimento a conversão do sulfato atingiu 78%.

A figura 6 apresenta a análise do Eh e pH, na qual é notória a relação entre as variáveis analisadas, ou seja, quando o pH aumenta o Eh fica negativo. A faixa de variação do pH fica entre 7,56 para valor inicial e 8,21 no final do experimento, e o valor de Eh chega a -428 mV.

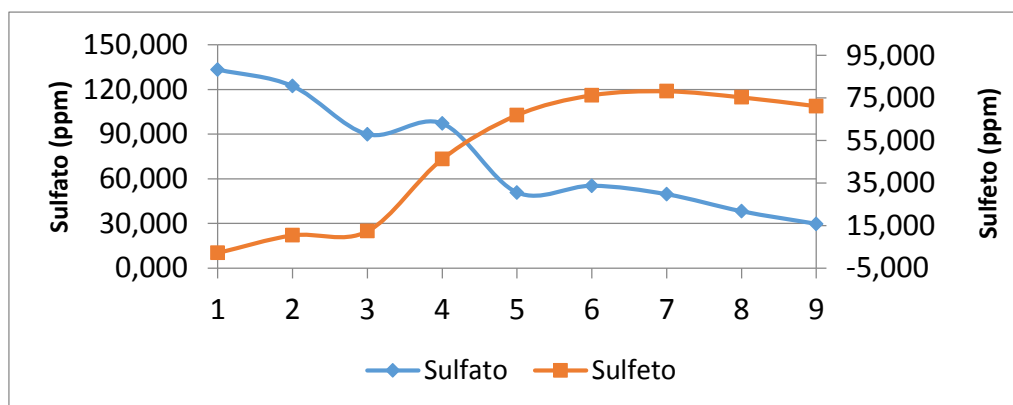


Figura 5: Consumo de Sulfato versus produção de sulfeto

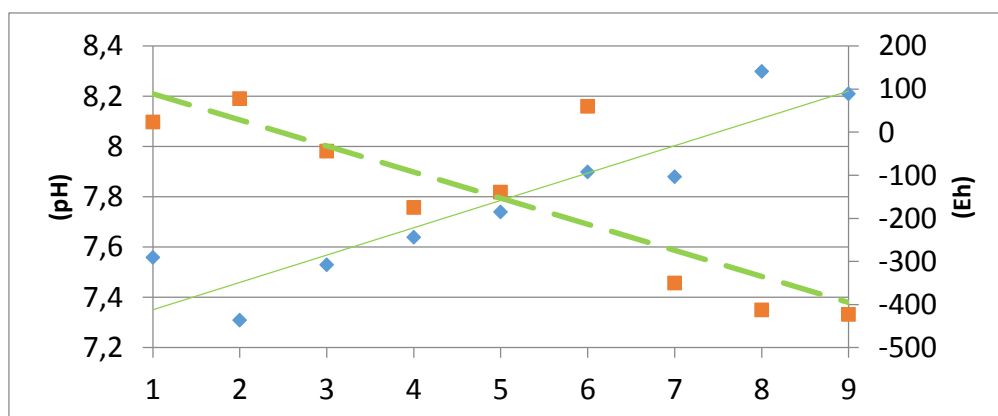


Figura 6: pH versus Potencial Redox (Eh)

Através da figura 7 e tabela 1, observa-se que no primeiro dia do experimento no tempo (t_0) houve um crescimento na densidade das BRS na ordem de 10^9 , comparando-se com a população inicial inoculada no reator (2×10^6 NMP/mL) antes da batelada em análise. Observa-se uma tendência diária de crescimento progressivo, porém com algumas oscilações nos demais dias provavelmente devido as zonas de estagnação do fluido em alguns setores, e possível liberação deste no decorrer do tempo. Gerando o aumento da atividade das BRS quando o meio é liberado, e redução quando este fica retido em área de estagnação do fluido.

Em relação ao potencial redox (Eh), observa-se que a medida que o Eh fica negativo ocorre aumento das BRS, indicando que a densidade bacteriana está diretamente correlacionada a este.

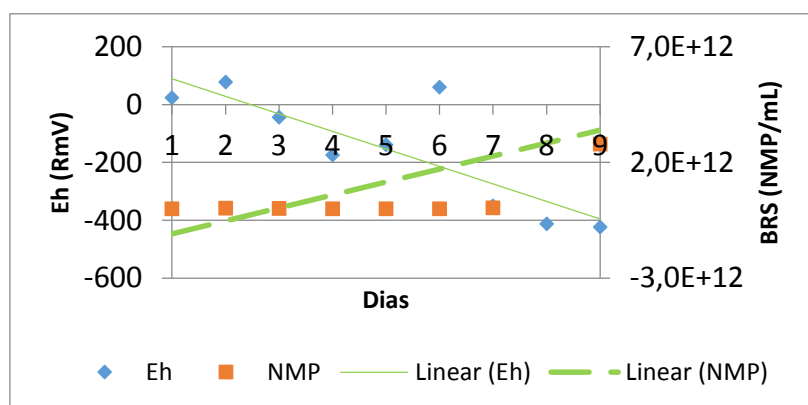


Tabela 1: NMP/mL de BRS

Tempo	BRS
0 h	4,6E+09
24 h	2,8E+10
48 h	1,5E+10
72 h	2,0E+08
96 h	2,4E+09
120 h	2,8E+09
144 h	4,6E+10
168 h	7,5E+12
192 h	2,8E+12

Figura 7 : Eh versus BRS (NMP/mL)

Conclusões

Observa-se que o sistema anaeróbio sulfetogênico favorece a formação de biofilme aderido ao meio poroso do biorreator, facilitando o crescimento da densidade microbiana das BRS, como apresentado na figura 7 e tabela 1. Quanto a análise entre os métodos de quantificar a população de BRS, observa-se eficiência tanto no NMP quanto ao FISH em identificar e quantificar as BRS.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPQ) pelo apoio financeiro Projeto número 402822/2013-7.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, P. F. et al. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. In: TAFT, C. A. (Ed.). **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. 1. ed. Kerala: Research Signpost, 2006. v. 661p. 197.

AMANN, R. I. et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1919–25, jun. 1990.

AGRAWAL, A.; VANBROEKHOVEN, K.; LAL, B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil-water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. **Anaerobe**, v. 16, n. 1, p. 12–8, mar. 2010.

BARTON, L. L.; CARPENTER, C. M. Suitability of fluorescence measurements to quantify sulfate-reducing bacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 93, n. 3, p. 192–7, jul. 2013.

CASTRO, H.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2000.

GLÖCKNER, F. O. et al. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. **Systematic and applied microbiology**, v. 19, p. 403–406, 1996.

MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 103–16, fev. 2000.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43 Spec No, n. February, p. 93–100, 2005.

POSTGATE, J. Sulphate reduction by bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, p. 505–520, 1959.

SANTOS, A. F. DE J. et al. Evaluation of the Fluorescence In Situ Hybridization Technique for Detection of Eubacteria and Sulfate-Reducing Bacteria from Samples of Water in Oil Fields. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 139–144, 2010.